

Departamento De Química

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA CONTROLE DA QUALIDADE
DE ALIMENTOS – ANÁLISE DE MICOTOXINAS**

SARA RAQUEL RATO PIRES

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Bioorgânica

Orientadora: Professora Doutora Elvira Gaspar

Lisboa

2009

A AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à professora Elvira Gaspar pelo carinho e amizade, pelos conselhos e conhecimentos transmitidos, mas sobretudo pelo exemplo dado. Mais do que uma professora, uma verdadeira amiga.

Agradeço aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado a darem apoio, que me deram liberdade de escolha e acreditaram sempre em mim.

Quero ainda agradecer aos meus colegas de laboratório, ao José, ao João e à Inês pela companhia e amizade nos muitos, longos e duros dias de trabalho.

Agradeço ainda a uma amiga muito especial que sempre esteve por perto a incentivar-me, Joana.

E por fim, quero agradecer a quem me ajudou a crescer e que algures no meu caminho foi tudo para mim.

O meu mais sincero muito obrigado a todos.

Dedico esta tese aos meus pais na esperança de saber que se orgulham muito de mim.

Education is the best provision for the journey to old age.

Aristotle

A patulina, é uma micotoxina com potencial carcinogénico, mutagénico e teratogénico produzida por fungos do tipo *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp e *Byssoclamys* spp, a qual pode ser encontrada em frutos como a maçã, sumos comerciais e outros produtos alimentares seus derivados.

Esta ocorrência obrigou diversas entidades reguladoras a estabelecerem limites máximos de patulina em vários produtos alimentares derivados de maçã, sendo diversos os métodos que têm sido utilizados para a sua análise.

Na presente dissertação são descritas duas metodologias analíticas para a identificação e quantificação desta toxina em matrizes alimentares.

Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada a optimização analítica e separação cromatográfica.

A dissertação apresenta a segunda parte dedicada à optimização da metodologia analítica, utilizando a extracção em fase sólida (SPE) como método de preparação de amostra e ao desenvolvimento de um novo método, recorrendo à microextracção por seringa empacotada (MEPS). Foram estudados os parâmetros experimentais que afectavam o desempenho destes métodos.

Os métodos analíticos foram validados no respeitante à sensibilidade, exactidão e precisão, podendo ser aplicados à análise da micotoxina em matrizes alimentares, em particular a maçãs e a sumos de maçã.

Patulin, is a mycotoxin with carcinogenic, mutagenic and teratogenic potential produced by *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp and *Byssoclamys* spp fungus, which can be found in fruits such as apples, commercial apple juices and other derivative products.

This occurrence compelled diverse regulating entities to establish maximum limits for patulin in some food products derived from apple. Different analytical methodologies are being used.

In the present thesis two analytical methodologies for the identification and quantification of this toxin in food matrices are described.

Using high performance liquid chromatography (HPLC) analytical optimization and chromatographic separation were carried out.

The second part of the thesis is dedicated to the optimization of an analytical methodology, using solid phase extraction (SPE) as sample preparation method and the development of a new method, employing microextraction by packed syringe (MEPS). The experimental parameters that affect the methods performance were studied.

The analytical methods were validated by its sensitivity, precision and accuracy, enabling its application to the analysis of the mycotoxin in food matrices, in particular to apples and commercial apple juices.

AAPRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese permitiram:

1 – Comunicação em painel no 15º Euroanalysis2009, 6 a 10 de Setembro de 2009, Innsbruck, Áustria: “Solid-Phase Extraction (SPE) in Patulin Analysis: Comparison With Small Scale Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) Methodology”.

2 – Publicação (full paper) Gaspar, E. M.; Pires, S.; Santana, J., (2009) “Solid-Phase Extraction (SPE) in Patulin Analysis: Comparison With Small Scale Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) Methodology”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, submetido.

AGRADECIMENTOS.....	II
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS.....	VI
ÍNDICE GERAL.....	VII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIV
1. Introdução.....	1
1.1. Micotoxinas.....	2
1.1.1. Contaminação de Alimentos.....	2
1.2. Patulina.....	3
1.2.1. Perspectiva histórica.....	3
1.2.2. Efeitos toxicológicos.....	4
1.2.3. Propriedades físicas e químicas.....	4
1.2.4. Fungos produtores.....	5
1.2.5. Ocorrência	5
1.3. Maçã e derivados	5
1.4. Legislação.....	6
1.5. Métodos analíticos para determinação de patulina em alimentos.....	6
1.5.1. Cromatografia em Camada Fina.....	7
1.5.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	7
1.5.3. Cromatografia Gasosa.....	8
1.5.4. Electroforese Capilar.....	9

1.6. Determinação de contaminantes.....	10
1.7. Princípios de extracção e separação.....	10
1.8. Preparação de amostra.....	11
1.8.1. Técnicas envolvendo amostras sólidas.....	11
1.8.1.1. Dispersão de matriz em fase sólida	11
1.8.2. Técnicas envolvendo amostras líquidas.....	12
1.8.2.1. Extracção líquido-líquido.....	12
1.8.2.2. Extracção em fase sólida	12
1.8.2.3. Microextracção em seringa empacotada.....	13
2. Resultados e Discussão.....	17
2.1. Objectivos.....	18
2.2. Optimização do método cromatográfico.....	18
2.2.1. Separação Líquida com gradiente.....	18
2.3. Análise de patulina.....	20
2.3.1. SPE-HPLC/DAD.....	22
2.3.2. MEPS-HPLC/DAD.....	23
2.4. Aplicação dos métodos analíticos a matrizes alimentares.....	24
2.4.1. Maçã infectada.....	24
2.4.2. Sumo de maçã comercial.....	26
3. Conclusões.....	28
4. Parte Experimental.....	30
4.1. Solventes e Padrões utilizados.....	31
4.2. Instrumentação e condições cromatográficas.....	31
4.2.1. Cromatografia Líquida (HPLC).....	31
4.2.1.1. Bomba e Detector.....	31
4.2.1.2. Coluna.....	31
4.2.1.3. Fases móveis.....	31

4.2.1.4. Forno.....	32
4.3. Metodologia.....	32
4.3.1. Preparação de Soluções Padrão de Patulina.....	32
4.3.2. Método cromatográfico com gradiente.....	32
4.3.3. Preparação de Amostras Fortificadas.....	33
4.3.4. Extracção em Fase Sólida.....	33
4.3.4.1. SPE – Método descrito.....	33
4.3.4.2. SPE – Método optimizado.....	34
4.3.5. Microextracção em seringa empacotada.....	34
4.3.5.1. MEPS – Método novo.....	34
4.3.6. Aplicação dos Métodos Analíticos a Matrizes Alimentares.....	35
4.3.6.1. Maçã Infectada.....	35
4.3.6.2. Sumo de Maçã Comercial Fortificado.....	35
5. Bibliografia.....	36

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5-HMF – 5-Hidroximetilfurfural

µg – unidade de massa, micrograma

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AOAC – Associação Oficial dos Químicos Analíticos, *AOAC International*

APCI – ionização química a pressão atmosférica

ARN – Ácido ribonucleico

BIN – *Barrel Insert and Needle assembly*

C¹³ – Carbono-13, isótopo do carbono.

C₁₈ – grupo octadecil

CE – electroforese capilar

CID – dissociação induzida por colisão

DAD – detector de fotodiodos

EOF – fluxo electro-osmótico

EC – Comissão Europeia

FAO – Food and Agriculture Organization

FDA – Food and Drug Administration

g – unidade de massa, grama

GC – cromatografia gasosa

GC-MS – cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa

GPC – cromatografia por permeação em gel

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-UV – cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta

kg – unidade de massa, quilograma

L – unidade de volume, litro

LC – cromatografia líquida

LC-MS – cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa

LLE – extracção líquido-líquido

LOD – limite de detecção

LOQ – limite de quantificação

MBTH – 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona · HCl

MECC – cromatografia capilar micelar electrocinética

MEPS – microextracção em seringa empacotada

mg – unidade de massa, miligrama

min – unidade de tempo, minutos

MIPs – polímeros molecularmente impressos

mL – unidade de volume, mililitro

mol – unidade de quantidade de substância, unidade de base do Sistema Internacional de Bases

MS – espectrometria de massa

MSPD – dispersão de matriz em fase sólida

ng – unidade de massa, nanograma

nm – unidade de comprimento, nanometro

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAH's – hidrocarbonetos poliaromáticos

PAT – Patulina

ppb – parte por bilião

R² – coeficiente de correlação

RSD – desvio padrão relativo

SIM – monitorização por ião seleccionado

SPE – extracção em fase sólida

SPME – microextracção em fase sólida

TLC – cromatografia em camada fina

UV – ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estruturas de micotoxinas. 1 Aflotoxina B ₁ , 2 Citrina e 3 Fumosimina B ₁	3
Figura 1.2 – Estrutura da patulina.....	4
Figura 1.3 – Estrutura do HMF.....	8
Figura 1.4 – Seringa MEPS (A) e Bin (B).....	13
Figura 1.5 – Esquema de utilização da MEPS.....	14
Figura 2.1 – Análise de Patulina por HPLC/DAD utilizando eluição por gradiente.....	19
Figura 2.2 – Análise de Patulina numa maçã infectada por HPLC/DAD utilizando eluição por gradiente.....	21
Figura 2.3 – Análise de Patulina num sumo de maçã comercial por HPLC/DAD utilizando eluição por gradiente.....	21
Figura 2.4 – Análise de patulina numa maçã infectada por SPE-HPLC/DAD.....	25
Figura 2.5 – Análise de patulina numa maçã infectada por MEPS-HPLC/DAD.....	25
Figura 2.6 – Análise de um sumo de maçã comercial fortificado (<i>spike</i> de 7,65 ng/50 µL) por SPE-HPLC/DAD.....	26
Figura 2.7 – Análise de um sumo de maçã comercial fortificado (<i>spike</i> de 7,65 ng/50 µL) por MEPS-HPLC/DAD	27

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Parâmetros quantitativos do método de análise de patulina por HPLC gradiente.....	19
Tabela 2.2 – Parâmetros de sensibilidade e de precisão do método de análise de patulina por HPLC gradiente.....	20
Tabela 2.3 – Recuperação, sensibilidade e precisão do método SPE.....	22
Tabela 2.4 – Recuperação, sensibilidade e precisão do método MEPS.....	24
Tabela 2.5 – Quantidade de Patulina determinada na maçã infectada	26
Tabela 2.6 – Quantidade de Patulina determinada num sumo de maçã comercial fortificado.....	27

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Micotoxinas

O termo micotoxina é derivado da palavra grega *Mykes* que significa fungo e *Toxicum* que significa veneno ou toxina.

As micotoxinas são metabolitos secundários com elevada toxicidade produzidos por fungos fitopatogénicos que provocam a deterioração de alimentos. De entre estes fungos podem nomear-se as espécies *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* [1].

Quimicamente as micotoxinas são moléculas relativamente pequenas mas com grande diversidade estrutural e por isso com variadíssimos efeitos biológicos [1].

1.1.1. Contaminação de Alimentos

A contaminação de alimentos com micotoxinas pode dever-se à influência de factores ambientais e biológicos que determinam a produção das mesmas. Nestes destacam-se a composição do substrato, a temperatura, a humidade, o pH, a competição microbiana e danos causados por insectos [1,2].

A contaminação pode ocorrer durante o crescimento, na colheita, no transporte, no armazenamento e/ou na processamento dos produtos [2].

As espécies *Aspergillus* e *Penicillium* encontram-se normalmente associadas à contaminação durante o armazenamento, enquanto que a espécie *Fusarium* pode produzir micotoxinas antes ou logo após a colheita [3].

Estão já descritos cerca de 400 metabolitos secundários produzidos por mais de 100 espécies de fungos.

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO) 25% da produção mundial agrícola está contaminada por fungos [3].

Para além do efeito devastador agrícola do crescimento de fungos, as toxinas por eles produzidas possuem um efeito nocivo para a saúde do ser humano, incluindo a carcinogénese, a teratogénese e o retardamento de crescimento [4].

As rações contaminadas destinadas a animais podem introduzir também na cadeia alimentar, de modo indirecto estas micotoxinas e seus metabolitos, através de produtos como leite, ovos e tecidos [4,5].

Aflotoxinas, citrinina, fumonisinas, ochratoxinas, patulina, tricotecenos e zearalenona encontram-se entre as micotoxinas (Figura 1.1) que têm recebido mais atenção nos últimos anos devido à sua ocorrência frequente e aos seus efeitos na saúde [6].

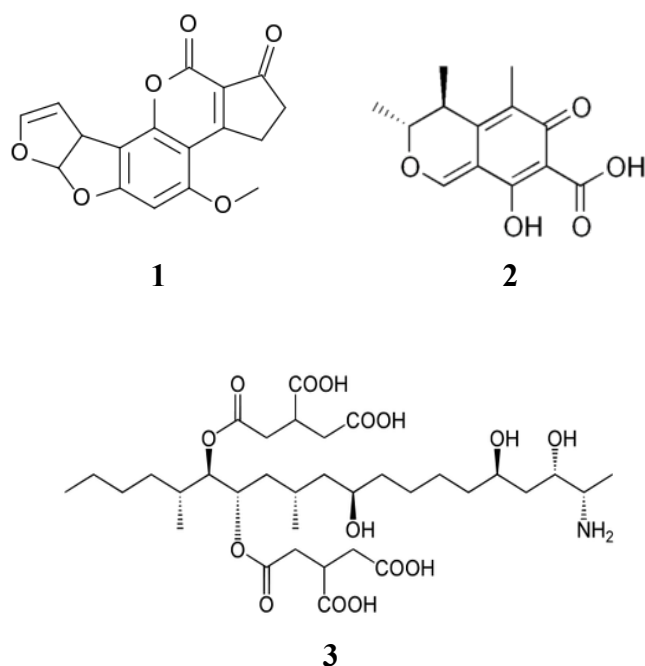


Figura 1.1 – Estruturas de micotoxinas. 1 Aflotoxina B₁, 2 Citrina e 3 Fumosimina B₁ [6].

1.2. Patulina

1.2.1. Perspectiva histórica

Em 1940, foi isolada uma micotoxina, patulina, inicialmente designada por clavacina, claviformina, clavatina, ácido gigante, expansina ou miocina C [7].

Após o seu isolamento, houve necessidade de testar a sua actividade biológica, tendo sido inicialmente classificada como antibiótico antifúngico de largo espectro. Mais tarde, veio a verificar-se que este composto tinha também a capacidade de inibir mais de 75 tipos de diferentes espécies de bactérias, entre elas bactérias Gram-positivas e negativas.

Iniciou-se então uma busca incansável por aplicações para o composto, sendo sugerida para tratamento da congestão nasal e de constipações. Pouco tempo depois surgiram evidências de que a sua toxicidade não afectava unicamente fungos e bactérias, mas que também revelava uma violenta toxicidade para animais e plantas [7,8].

1.2.2. Efeitos toxicológicos

Clinicamente a toxicidade da patulina tem-se manifestado sob a forma de: nervosismo, convulsões, congestionamento do pulmão, edema, hiperemia, distensão do tracto gastrointestinal, hemorragia intestinal e degeneração das células epiteliais, efeitos crónicos tais como genotoxicidade, neurotoxicidade, imunotoxicidade, imunossupressão, teratogénese e por último mas não menos graves têm sido também atribuídos efeitos a nível celular sendo alguns exemplos destes efeitos a ruptura de membranas plasmáticas, a inibição da síntese de proteínas e a inibição da síntese de ADN e de ARN [7].

1.2.3. Propriedades físicas e químicas

Actualmente conhecido como patulina (PAT) (Figura 1.2) e de nome IUPAC 4-hidroxi-4H-furo[3,2c]piran-2[6H]-ona, o composto caracteriza-se por ser uma lactona, de fórmula empírica $C_7H_6O_4$, massa molecular $154,12 \text{ g mol}^{-1}$ e que apresenta um espectro de absorção muito intenso a 276 nm [7,9].

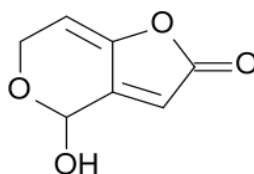


Figura 1.2 – Estrutura da patulina.

A patulina é um composto muito solúvel em água e nos solventes orgânicos mais comuns. Esta micotoxina apresenta estabilidade em ácidos diluídos e é resistente à temperatura de 125°C numa gama de pH entre 3,5 e 5,5 [10].

1.2.4. Fungos produtores

As principais espécies de fungos produtoras de patulina em alimentos são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Byssochlamys spp* [7,12]. Das espécies *Penicillium* identificadas como produtoras de patulina a *P. expansum* é a responsável pela grande maioria da deterioração das frutas [13].

Tanto os fungos *Penicillium* como os *Aspergillus* possuem a capacidade de crescimento a baixas temperaturas, mesmo aquando o armazenamento das frutas, não sendo este factor físico impeditivo da produção de patulina [2].

Por sua vez, os fungos do género *Byssochlamys* são responsáveis pela produção de patulina em estados de pós-pasteurização, devido à sua capacidade de sobrevivência a tratamentos térmicos, aplicados aos derivados das frutas [2].

1.2.5. Ocorrência

Estirpes fúngicas produtoras de patulina têm sido isoladas ao longo dos anos em diversos frutos e vegetais incluindo maçãs, uvas, cerejas, peras, alperces, morangos, nectarinas, framboesas, pêssegos, ameixas, tomates, bananas, amêndoas, amendoins e avelãs [7].

1.3. Maçã e derivados

Os produtos alimentares à base de frutos são classificados quanto à sua qualidade recorrendo a indicadores de contaminação. Especificamente em produtos alimentares, a qualidade pode ser caracterizada pelo crescimento observável de fungo, existência de odor desagradável e desintegração da fruta. Estes produtos alimentares, aquando da deterioração por fungos, exibem uma profunda alteração devida à produção de enzimas pectinolíticas desintegrativas responsáveis pela degradação dos tecidos das frutas [14,15].

A maçã sendo um fruto de clima temperado é dos frutos mais comercializados a nível mundial. No entanto, apenas as maçãs que possuam um determinado conjunto de características podem ser comercializadas *in natura*. O nível de qualidade da fruta é atribuído

pelo seu sabor, tamanho, forma, consistência e aparência, sendo através destas características seleccionado o seu destino, o consumo ou o processamento em sumos e outros derivados [10].

Têm sido realizados estudos em diversos países sobre a ocorrência de patulina em sumos de maçã e em todos eles foram encontradas amostras contaminadas por patulina. A patulina foi detectada em maçãs na África do Sul [16], Canadá, Inglaterra, Nova Zelândia, Estados Unidos e Austrália, e em sumos de maçã na África do Sul, Áustria, Brasil, Canadá, Estados Unidos, Itália, Suécia e Turquia [7,13,17].

1.4. Legislação

As entidades reguladoras, à luz das evidências, foram obrigadas a colocar avisos nos produtos alimentares contaminados por este composto. Na Europa e nos EUA a preocupação com esta problemática deu origem à implementação de níveis máximos para conteúdo de patulina em derivados de maçã [7].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em associação com a *Food and Drug Administration* (FDA) aconselha um máximo de ingestão diária de patulina de $0,4 \mu\text{gkg}^{-1}$ de massa corporal [18].

Recentemente a União Europeia adoptou $50 \mu\text{gL}^{-1}$ como limite máximo para sumos de maçã e derivados, estabeleceu para produtos sólidos como compotas e purés de maçã o limite máximo de $25 \mu\text{gkg}^{-1}$ e ainda $10 \mu\text{gkg}^{-1}$ para produtos destinados a crianças [19].

1.5. Métodos analíticos para determinação de patulina em alimentos

A implementação de limites máximos para produtos alimentares derivados de maçã veio obrigar a um controle de qualidade mais exigente. Para este controle surgiu a necessidade de se desenvolverem métodos eficazes na detecção e quantificação da patulina.

Entre os variadíssimos métodos, simples ou mais sofisticados, encontram-se a cromatografia em camada fina (TLC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia gasosa (GC) e a electroforese capilar (CE).

1.5.1. Cromatografia em Camada Fina

A metodologia pioneira usada na identificação e quantificação de patulina nos sumos de maçã foi a cromatografia em camada fina (TLC) com as vantagens de ser simples e de baixo custo económico [17].

Um dos métodos oficiais da Associação Oficial dos Químicos Analíticos (AOAC) para análise desta micotoxina utiliza TLC o qual foi aprovado com base num estudo desenvolvido em 1974. Este método envolve a preparação de amostra através de extracção com acetato de etilo e seguida de purificação por coluna cromatográfica de sílica-gel. A detecção nas placas de sílica-gel é realizada por revelação com 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona·HCl (MBTH). O limite de detecção descrito foi de 20 µgL⁻¹ [20].

Foram descritos também métodos alternativos de detecção e quantificação de patulina utilizando fluorodensitometria, como meio de avaliar a formação de derivados fluorescentes por exposição a vapores de amónio, ou densitometria, seguindo a absorvância-transmitância a 275 nm [20,21].

Mais tarde, a utilização de placas de TLC de fase reversa foi investigada, mas apesar da patulina ser facilmente eluída nestas placas por uma grande variedade de solventes, esta técnica não foi aplicada a amostras contaminadas naturalmente [20].

1.5.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Actualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por ultravioleta (UV) ou fotodiodos (DAD) é o método mais utilizado na quantificação de patulina em derivados de fruta [20]. Esta metodologia é a mais vulgarmente utilizada no que diz respeito à determinação e quantificação de patulina pois trata-se de um composto muito solúvel em água, relativamente polar e com um espectro de absorção característico [22,23].

A AOAC adoptou também como método o HPLC-UV para a quantificação de patulina em sumos de maçã com um limite de detecção descrito de 5 µgL⁻¹ (método oficial 995.10) utilizando como preparação de amostra a extracção líquido-líquido. Na cromatografia líquida é utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ com tamanho de partícula de 5µm e tamanho de poro de 12 a 25 nm, a eluição é isocrática com fluxo 1mLmin⁻¹, sendo o eluente composto por

3% a 10% de acetonitrilo em água acidificada (0,095 partes por volume de ácido perclórico a 60%); a detecção utiliza um detector de UV a 276 nm [7,20].

Métodos semelhantes ao implementado têm sido descritos para a determinação da micotoxina em sumos de maçã [20] e recentemente nos derivados sólidos [24]. Estes estudos relatam alterações ao método AOAC na preparação de amostra e no processo cromatográfico.

Recentemente foi desenvolvido um método de HPLC com detecção por espectrometria de massa (MS). No método descrito a detecção baseia-se no princípio de dissociação induzida por colisão (CID) utilizando a pressão atmosférica e ionização química (APCI), com um limite de detecção descrito de $4 \mu\text{gL}^{-1}$ [25].

Na análise dos derivados da maçã pode encontrar-se um agente interferente bastante comum, o 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) (Figura 1.3), o qual pode afectar drasticamente a quantificação de patulina.

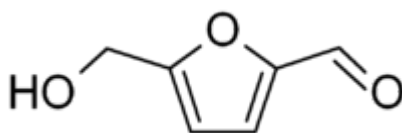


Figura 1.3 – Estrutura do 5-HMF.

O 5-HMF é um produto da desidratação de ceto-pentoses e hexoses a pH baixo ou a temperaturas elevadas o que pode acontecer durante o processamento ou armazenamento de produtos alimentares ricos em hidratos de carbono, tendo já sido quantificado por HPLC-UV e eliminada a sua interferência em análise por HPLC-MS [22,25,26].

1.5.3. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (GC) tem sido aplicada na análise de uma variedade de micotoxinas. A técnica tem demonstrado resultados interessantes apesar do HPLC ser o método favorito. Nas análises por GC descritas, a patulina foi detectada através de um derivado (sililado) utilizando espectrometria de massa com ionização por impacto electrónico ou usando detecção por captura electrónica [7,20,27].

A patulina (não derivatizada) foi já determinada em sumos de maçã por GC-MS com ionização química negativa [28].

A sua análise foi também já efectuada utilizando GC com controlo de pressão electrónica, injeção *on-column*, e monitorização selectiva de iões (SIM); com limite de detecção descrito de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ [7,20].

Foi igualmente descrita a determinação, em extractos de sumos de maçã, do derivado sililado obtido utilizando o agente derivatizante bis(trimetil-silil)trifluoracetamida. A presença de derivados de patulina e de HMF foi efectuada utilizando-se impacto electrónico (EI) como modo de ionização e com aquisição em modo SIM [29].

Noutro estudo de 1999, é relatada a extracção por diálise bifásica, acilação *in situ* e análise por GC-MS(SIM) para detecção e quantificação de patulina (acetilada) em sumos. Neste estudo, às amostras de sumos de maçã foram adicionados 4-*N,N*-dimetilaminopiridina, cloreto metílico e anidrido acético no tubo de diálise [30].

Ainda no mesmo ano, um outro trabalho baseia a detecção em patulina marcada com C^{13} . Embora o método tenha utilizado HPLC-MS a análise por GC-MS demonstrou maior reprodutibilidade e foi descrito um limite de detecção mais baixo [31].

1.5.4. Electroforese Capilar

A electroforese capilar é uma técnica separativa desenvolvida com base nos conhecimentos adquiridos com HPLC.

Em 2000, um estudo utilizando a electroforese capilar foi publicado como método analítico rápido e muito sensível para a análise de patulina em cidra. A técnica utiliza uma coluna capilar de sílica fundida, eluída com um tampão aquoso ao qual aplica-se um campo eléctrico.

A separação é alcançada por migração das partículas carregadas no tampão. Os cations migram para o cátodo e os aniões migram para o ânodo sob a influência de um fluxo electro-osmótico (EOF). Compostos ou misturas de compostos neutros e carregados podem ser analisados por electroforese capilar micelar electrocinética ou cromatografia capilar micelar electrocinética (MECC).

Este método é descrito como tendo a vantagem de requerer pequenas quantidades de amostra e de exigir o consumo de uma quantidade mínima de solventes orgânicos quando

comparada com o HPLC. A detecção foi realizada utilizando DAD, extracção a 273 nm e descrito o limite de detecção de $3,8 \mu\text{gL}^{-1}$ [32].

1.6. Determinação de Contaminantes

A determinação de contaminantes vestigiais em matrizes reais complexas, como as alimentares, requer muitas vezes uma preparação de amostra exaustiva envolvendo extracção, *clean-up* e concentração. Saliente-se o facto de a preparação de amostra ser dependente da matriz e do analito e de em certas situações ser necessária a derivatização.

Tendo em conta que os limites legais têm tendência a diminuir, as metodologias a empregar são obrigadas a ser cada vez mais sensíveis.

Na detecção por espectrometria de massa o efeito de matriz pode ter um efeito catastrófico na eficiência de ionização, no ruído e consequentemente nos limites de detecção.

Deste modo, e para qualquer técnica de análise, quanto mais “limpa” a amostra melhor é o resultado cromatográfico e maior é a sensibilidade.

Embora a cromatografia seja utilizada depois da extracção como processo separativo, a técnica pode ser utilizada como método de preparação de amostra. Métodos como GC, LC ou cromatografia por exclusão por tamanho/cromatografia por permeação em gel (GPC) podem ser utilizadas como técnicas de *clean-up* [33].

1.7. Princípios de extracção e separação

A extracção selectiva de analitos tem por base as diferenças de propriedades químicas e físicas, entre as quais, massa molecular, solubilidade, polaridade e volatilidade.

Dependendo da matriz e do analito diferentes técnicas de extracção de amostra podem ser utilizadas.

A derivatização é utilizada para aumentar a volatilidade de um composto ou para adicionar grupos funcionais para aumentar a sensibilidade do método de análise.

Os derivados de patulina descritos foram obtidos através da reacção com *N,O*-bis(trimetil-silil)trifluoroacetamida obtendo-se o derivado sililado [27] ou por reacção com 4-*N,N*-dimetilaminopiridina e anidrido acético resultando o derivado acetilado [30].

1.8. Preparação de amostra

Na preparação de amostra o objectivo principal é extrair o analito da matriz original para um solvente, sendo a extracção influenciada pela solubilidade, pela transferência de massa e pelos efeitos de matriz.

O modo como a matriz é manipulada é um factor muito importante. Disso depende a reprodutibilidade dos resultados por poder influenciar negativamente o rendimento de extracção.

Amostras sólidas podem ter de envolver moagem ou secagem, prévias à extracção por solventes, podendo então ser tratadas como amostras líquidas e proceder-se ao *clean-up* e concentração.

As amostras líquidas podem ser extraídas (líquido-líquido) ou submetidas a métodos sortivos [33].

1.8.1. Técnicas envolvendo amostras sólidas

As amostras sólidas implicam, muitas vezes, a utilização de técnicas básicas de laboratório como a peneira, moagem e secagem no tratamento de amostra.

A dispersão pode ser usada como meio de evitar a agregação da amostra com o objectivo de atingir uma boa extracção.

Incluídas nas técnicas de extracção de amostras sólidas estão a extracção por fluido supercrítico, a extracção ultrassónica e a extracção por líquido pressurizado [33].

1.8.1.1. Dispersão da matriz em fase sólida

A dispersão de matriz em fase sólida (MSPD), surgiu pela primeira vez em 1989, e foi desenvolvida para amostras sólidas e semi-sólidas. Esta técnica tem como características principais o uso de pequenas quantidades de amostra, baixo consumo de solventes orgânicos, a realização da extracção numa única etapa com o *clean-up*, baixo custo e rapidez.

Recentemente, a MSPD-HPLC-UV foi utilizada para a preparação de amostra sólidas de maçã e em concentrados de sumo de maçã [34,35].

1.8.2. Técnicas envolvendo amostras líquidas

Uma das técnicas mais simples de preparação de amostras líquidas é a destilação, a qual permite a separação de componentes duma mistura através de manipulação dos pontos de ebulição e das pressões de vapor relativas.

No entanto, a maioria dos métodos de preparação envolvendo este tipo de amostras são baseados no fenómeno partição/partilha.

1.8.2.1. Extracção Líquido-Líquido

A maioria dos métodos utiliza como preparação de amostra a extracção líquido-líquido (LLE), a qual se baseia na partição da amostra entre duas fases imiscíveis, orgânica e aquosa, em que a eficiência da separação é determinada pela solubilidade do analito no solvente de extracção, pela razão de fases e pelo número de extracções [11,13,25].

1.8.2.2. Extracção em Fase Sólida

A extracção em fase sólida (SPE) envolve uma competição, onde a fase extractiva é o sólido. Esta técnica tem sido muito utilizada para remover ou concentrar substâncias de matrizes líquidas presentes em quantidade vestigial.

Uma grande variedade de adsorventes pode ser utilizada, desde fases de sílica modificadas de C₈ a C₁₈ (fases reversas), resinas poliméricas, alumina, carvão, sílica e ciano e outras. A escolha da fase que constitui o cartuxo de SPE condiciona o método.

Um problema associado à SPE é o facto da fase necessitar de ser uniforme de modo a evitar baixas eficiências. Neste método o efeito de matriz pode se antever devido à competição que possa ocorrer entre o analito desejado e os demais componentes da matriz. As vantagens da SPE sobre a LLE são a necessidade de menos tempo para preparação de amostra e poder ser completamente automatizada, requerendo menor quantidade de solventes e permitindo maior selectividade.

A SPE tem sido utilizada por diversos autores na preparação de amostra, como método de extracção e/ou purificação de patulina [20,23,24,36,37].

1.8.2.3. Microextração em seringa empacotada

A microextração por sorvente empacotado ou em seringa empacotada (MEPS), representada na Figura 1.4, é uma técnica desenvolvida recentemente por Abdel-Rehim, patenteada em 2003, e baseia-se basicamente na miniaturização da SPE [38,39].



Figura 1.4 – Seringa MEPS (A) e BIN (B) [40].

Na MEPS, uma pequena quantidade de fase estacionária encontra-se empacotada no tambor designado por *BIN* (*Barrel Insert and Needle assembly*, Figura 1.4 **B**), de uma seringa *gastight* (100 μL – 250 μL).

Vantagens da MEPS

A MEPS tem por objectivo a eliminação de interferentes que constituem as matrizes, permitindo isolar selectivamente e concentrar analitos, isto é, permite realizar funções idênticas à SPE.

A maioria dos métodos de preparação de amostra utiliza a extração líquido-líquido a qual requer volume de amostra, solventes e tempo. No entanto, a MEPS poderá ter vantagens [40] relativamente à SPE:

- Reduzir o tempo de preparação de amostra e de injeção;
- Permitir a ligação *on-line* a LC ou GC, onde os passos de extração e injeção realizados automaticamente com a mesma seringa;
- Permitir a redução dos volumes de solventes necessários;
- Trabalhar com amostras na ordem dos μL comparativamente aos mL necessários para a SPE.

Modo geral de utilização

Após o condicionamento da fase estacionária, a amostra é puxada de modo a passar por esta, podendo usar-se mais do que um volume neste passo ou puxar/empurrar o mesmo volume múltiplas vezes (processo múltiplo).

De seguida, a fase estacionária pode ser lavada utilizando uma solução de lavagem apropriada com o objectivo de eliminar apenas interferentes da matriz e não o analito.

A eluição do analito realiza-se puxando um solvente de extracção, posteriormente injectado directamente no sistema cromatográfico.

O acondicionamento da MEPS efectua-se passando solvente de extracção pela fase estacionária seguido da solução de lavagem, ficando assim preparada para a amostra seguinte.

Na Figura 1.5 encontra-se esquematizado o modo de manuseamento da MEPS.

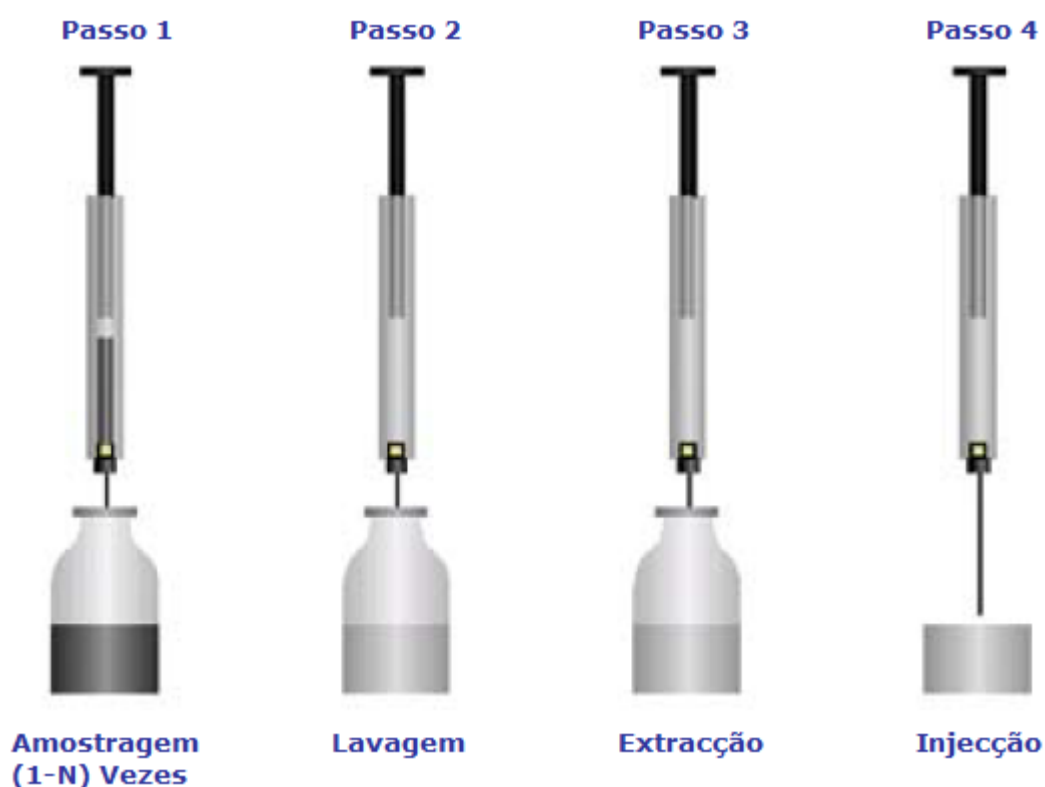


Figura 1.5 – Esquema de utilização da MEPS [40].

Factores que Afectam o processo MEPS:

Tipo de Fase Estacionária

A selecção da fase estacionária é um parâmetro importante para a obtenção de um *clean-up* aceitável e de uma boa recuperação, sendo ainda dependente das propriedades do analito [41]. Para a MEPS encontram-se já disponíveis como fases estacionárias:

- Sílica modificada em C₂, C₈, C₁₈;
- Ácido benzenossulfónico para troca catiónica;
- Polimérico: partículas de poliestireno;
- Polímeros molecularmente impressos (MIPs);
- Fases orgânicas monolíticas.

Condicionamento da Fase Estacionária

Se utilizar uma fase estacionária reversa, o condicionamento deve garantir a activação da mesma e a reprodutibilidade da retenção dos analitos. Regra geral o último solvente de condicionamento deve ser o mesmo solvente da amostra [41].

Introdução da Amostra

A amostra deve ser introduzida lentamente (20 μLs^{-1}) de modo a permitir uma boa interacção entre a fase estacionária e o analito. O volume de amostra introduzido pode ser de 25 μL a 250 μL .

Caso seja necessário, a amostra pode ser puxada/empurrada múltiplas vezes para se conseguir a concentração dos analitos [41].

Lavagem da Fase Estacionária

A lavagem pode ter consequências dramáticas no parâmetro recuperação do método pelo que este passo deve ser cuidadosamente seleccionado.

Geralmente, quando se utilizam fases reversas este passo é realizado com água acidificada e a uma velocidade de 50 μLs^{-1} [41].

Extracção dos Analitos

Sendo a quantidade de fase estacionária bastante pequena, para a extracção dos analitos de interesse é necessário um pequeno volume de solvente.

A utilização desta pequena quantidade permite a injeção (directa) e análise de todo o extracto [41].

Recondicionamento da Fase Estacionária

Esta fase tem a finalidade de limpar a fase estacionária utilizando-se o solvente de extracção, seguido do condicionamento da fase para a amostra seguinte usando-se o solvente de lavagem [41].

Aplicação da MEPS

A utilização da MEPS foi descrita na preparação de plasma humano para a determinação de anestésicos e seus metabolitos, e análise de contaminantes de águas como hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs); foi já igualmente descrita na utilização com vinhos na determinação de anisóis halogenados [42,].

Esta técnica nova tem sido utilizada, com sucesso, em métodos que envolvem LC-MS e GC-MS [41,43,44].

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Objectivos

Este trabalho teve como objectivo a optimização e o desenvolvimento de metodologias de preparação de amostra úteis na análise (detecção e identificação) de patulina.

Um dos métodos foi adaptado e optimizado e utiliza a extracção em fase sólida (SPE); o outro trata-se de um novo método que envolve a microextracção em seringa empacotada (MEPS). Ambos foram associados à cromatografia líquida com detecção por fotodiodos (HPLC-DAD).

As metodologias foram aplicadas a importantes matrizes da cadeia alimentar, maçã e sumo de maçã, tendo sido realizadas as respectivas validações analíticas.

2.2. Optimização do método cromatográfico

Foi primeiramente optimizado o método de separação cromatográfica de patulina por HPLC/DAD descrito por Gaspar *et al* [26].

2.2.1. Separação líquida com gradiente

O método cromatográfico previamente descrito [26] para a separação da patulina do seu interferente mais comum, o 5-hidroximetilfurfural, foi optimizado no respeitante ao tempo de análise, utilizando uma eluição com gradiente representado na Figura 2.1.

A separação cromatográfica utilizou como fases móveis as misturas **A**: água–acetonitrilo–ácido perclórico ((97:3):0,01 (v/v)) e **B**: acetonitrilo–ácido perclórico (100:0,01 (v/v)), a uma temperatura de 15°C, usando o programa descrito no ponto 4.3.2. da secção experimental.

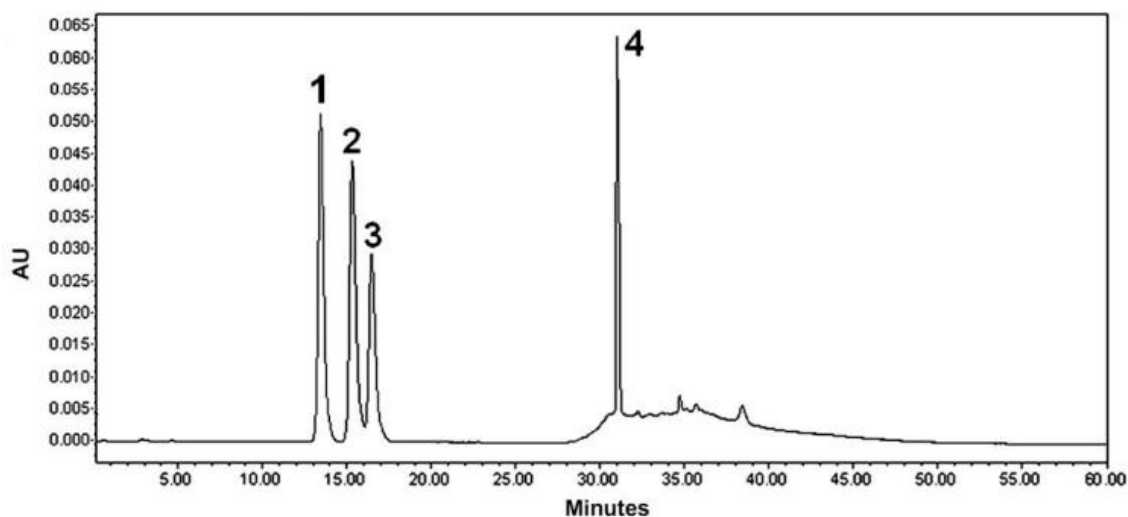


Figura 2.1 – Análise de Patulina por HPLC/DAD utilizando eluição por gradiente (coluna XBridge C₁₈ 5µm, fluxo: 1,0 mLmin⁻¹), condições descritas no ponto 4.3.2. da secção experimental, a 15°C de temperatura. 1 5-hidroximetilfurfural, 2 2-Furfural, 3 patulina e 4 5-metilfurfural. Detecção: DAD; cromatograma extraído a 280 nm.

O método analítico foi validado através da determinação dos seus parâmetros de qualidade: limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), gama de linearidade, sensibilidade e precisão.

A linearidade da resposta foi calculada recorrendo ao uso de soluções padrão de patulina na gama de concentrações 30 ppb a 500 ppb. A gama de linearidade, equação de calibração e coeficiente de correlação (R^2) obtidos encontram-se na Tabela 2.1.

O método cromatográfico apresentou uma boa linearidade de resposta para a gama estudada, com valor de R^2 próximo de 1.

Tabela 2.1 – Parâmetros quantitativos do método de análise de patulina por HPLC gradiente.

Gama (µg L ⁻¹)	Linearidade	
	Recta de Calibração	R^2
30 – 500	$y = 136592x - 2161,5$	0,9996

A sensibilidade do método foi determinada através do cálculo dos limites de detecção e quantificação. Os valores obtidos para o LOD e para o LOQ foram de 2,0 μgL^{-1} e 6,0 μgL^{-1} respectivamente (Tabela 2.2), encontrando-se ambos abaixo do valor máximo permitido por lei [19].

Relativamente à determinação da precisão do método, a repetibilidade e a reprodutibilidade foram calculadas e expressas em percentagem de desvio padrão relativo (RSD). A repetibilidade do método apresentou um RSD de aproximadamente 8% enquanto que a reprodutibilidade apresentou um valor de 3,5%, tal como se encontra na Tabela 2.2. Os valores obtidos, abaixo dos 10%, indicam uma boa precisão para o método desenvolvido [45,46].

Tabela 2.2 – Parâmetros de sensibilidade e precisão do método de análise de patulina por HPLC gradiente.

LOD	LOQ	Repetibilidade	Reprodutibilidade
(μgL^{-1})	(μgL^{-1})	(RSD,%), n = 3	(RSD,%), n = 3
2,0	6,0	7,8	3,5

2.3. Análise de patulina

O método cromatográfico foi aplicado a duas matrizes alimentares, maçã infectada e sumo de maçã, encontrando os cromatogramas apresentados nas Figuras 2.2 e 2.3.

No cromatograma respeitante ao extracto de maçã infectada (Figura 2.2) é possível identificar a presença de patulina (**PAT**), no entanto, e nas mesmas condições cromatográficas, na análise de patulina do sumo de maçã comercial não foi possível detectar o composto (Figura 2.3).

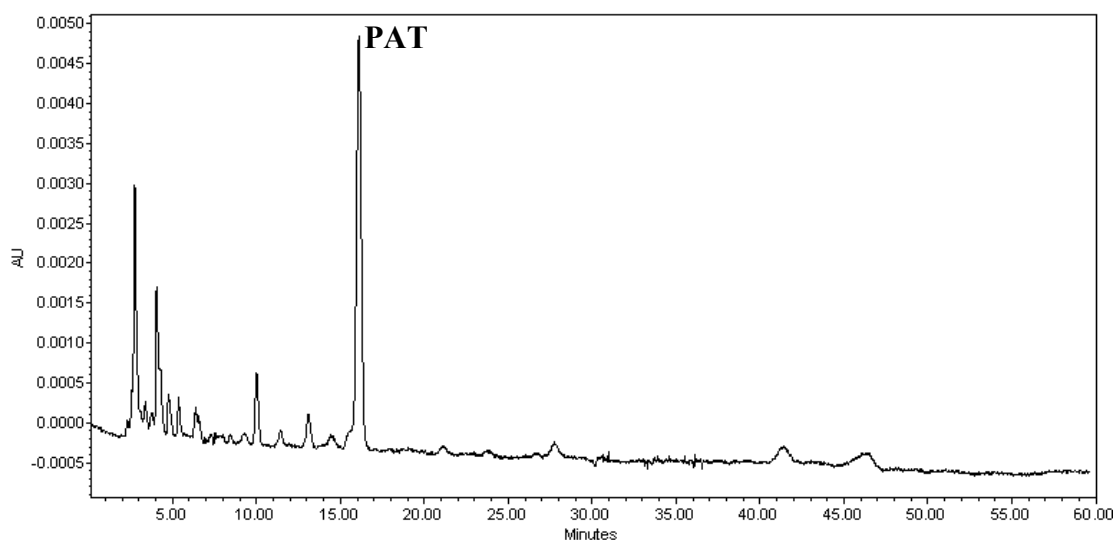


Figura 2.2 – Análise de Patulina numa maçã infectada por HPLC/DAD utilizando eluição por gradiente. Coluna XBridge C₁₈ 5μm, fluxo: 1,0 mLmin⁻¹, eluição por gradiente a 15°C, condições descritas no ponto 4.3.2. da secção experimental. Detecção: DAD; cromatograma extraído a 280 nm.

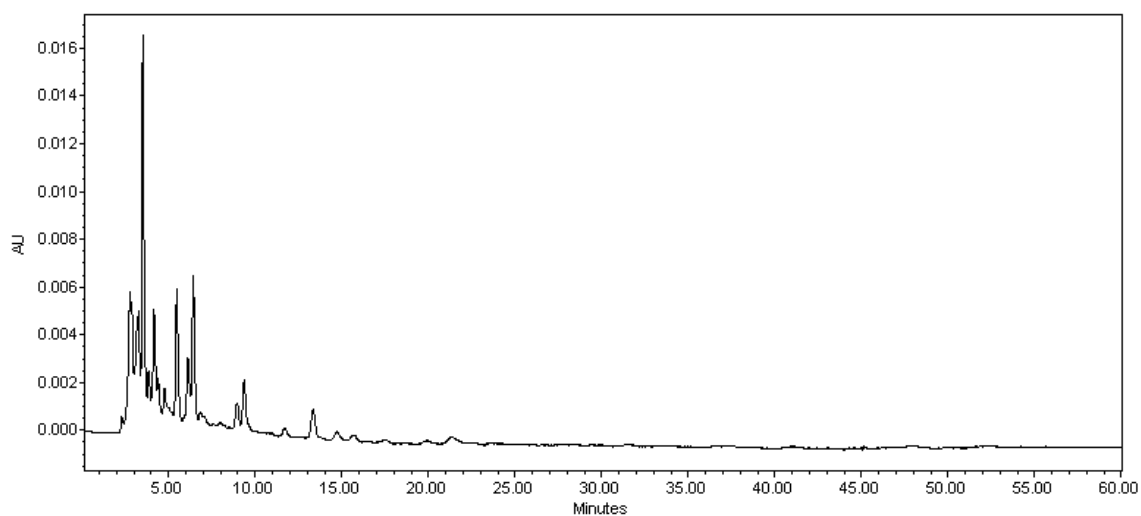


Figura 2.3 – Análise de Patulina num sumo de maçã comercial por HPLC/DAD utilizando eluição por gradiente. Coluna XBridge C₁₈ 5μm, fluxo: 1,0 mLmin⁻¹, eluição por gradiente a 15°C, condições descritas no ponto 4.3.2. da secção experimental. Detecção: DAD; cromatograma extraído a 280 nm.

2.3.1. SPE-HPLC/DAD

Um método cromatográfico pode envolver duas etapas: a preparação de amostra e a separação/quantificação do analito.

O processo de preparação de amostra, tem como objectivo libertar o analito da matriz, remover interferentes e/ou ajustar a concentração do analito de modo a permitir a sua detecção.

A utilização de SPE na análise de patulina foi recentemente descrita [36]. Contudo, não nos foi possível reproduzir os resultados aí mencionados.

Foi então necessário proceder à optimização desta metodologia analítica para a análise de patulina.

Usando amostras fortificadas, procedeu-se ao estudo dos seguintes parâmetros: condicionamento da coluna; introdução da amostra; lavagem da coluna; e extracção da patulina.

O condicionamento da coluna foi realizado à semelhança do descrito [36], tendo sido alterado o último solvente de condicionamento: em vez de água utilizou-se água acidificada (H_2O MilliQ-ácido perclórico ((100):0,01, (v/v)) de modo a não haver diferença entre o pH da coluna de SPE e o da amostra.

Em vez de se utilizar hexano para a lavagem da coluna utilizou-se água acidificada pois perante uma coluna de fase reversa, este é um solvente com menor força eluotrópica.

O passo de secagem da coluna foi eliminado uma vez que a presença de vestígios do solvente de lavagem não interfere com a extracção da mesma; os solventes de extracção descritos foram substituídos por metanol.

Após a optimização dos parâmetros procedeu-se ao estudo da recuperação do método.

Tabela 2.3 – Recuperação, sensibilidade e precisão do método SPE.

Recuperação	Repetibilidade	Reprodutibilidade
(RSD,%), n = 3	(RSD,%), n = 3	(RSD,%), n = 3
82 (6)	1,2	2,2

Para o estudo das recuperações foram utilizadas triplicadas de amostras fortificadas. A recuperação obtida foi de 82%, com um valor de RSD de 6%, valores estes expressos na Tabela 2.3.

A repetibilidade do método apresentou um RSD de aproximadamente 1% enquanto que a reprodutibilidade apresentou um valor de 2,2% (Tabela 2.3). Os valores obtidos, abaixo dos 10%, indicam uma boa precisão para o método desenvolvido [45,46].

O método otimizado possui boas recuperações, é económico, rápido e é possível ser automatizado.

2.3.2. MEPS-HPLC/DAD

Para a análise de patulina foi desenvolvido um novo método de preparação de amostra utilizando a microextração em seringa empacotada (MEPS) (associada à cromatografia líquida).

A utilização da MEPS, na prática, significa a miniaturização da SPE utilizando-se poucos microlitros de amostra, possibilitando igualmente a remoção de componentes interferentes e ainda o isolamento do analito em estudo.

Tendo em consideração o método SPE, foi utilizada também na MEPS a fase estacionária de sílica modificada em C₁₈.

Foram então estudados os parâmetros que afectam o desempenho deste novo método, tendo sido encontrados os melhores resultados efectuando:

- O condicionamento da fase estacionária com metanol e água acidificada, uma vez que o condicionamento desta com acetonitrilo e água acidificada revelou um efeito negativo na recuperação do método.
- A introdução da amostra de forma fraccionada, que permitiu obter melhor recuperação do que com introdução de modo único. A recuperação da amostra não se mantém quando se introduz a amostra na forma 2 x 25 µL e 1 x 50 µL.
- A omissão do passo de lavagem. A realização deste passo reflectia-se na perda de aproximadamente 30% da amostra.
- A extracção com metanol que deu origem aos melhores valores de recuperação.

Para a validação procedeu-se aos estudos de recuperação, sensibilidade e precisão do método, os quais estão enumerados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Recuperação, sensibilidade e precisão do método MEPS.

Recuperação	Repetibilidade	Reprodutibilidade
(RSD,%), n = 5	(RSD,%), n = 5	(RSD,%), n = 3
69 (4)	3,2	4,0

O estudo da recuperação foi realizado com amostras fortificadas (gama de concentrações 200 ppb a 600 ppb). A recuperação obtida foi de 69% com um valor de RSD de 4%. A repetibilidade do método apresentou um RSD de 3,2% enquanto que a reprodutibilidade apresentou um valor de 4,0% (Tabela 2.4). Mais uma vez, os valores obtidos encontraram-se abaixo dos 10%, indicando uma boa precisão para o método desenvolvido [45,46].

Esta nova metodologia permitiu obter resultados que o tornam uma alternativa rápida e económica ao método SPE.

2.4. Aplicação dos métodos analíticos a matrizes alimentares

Os métodos anteriormente descritos foram aplicados na análise de duas matrizes alimentares: maçã infectada e sumo de maçã comercial.

2.4.1. Maçã infectada

A maçã é um fruto mundialmente comercializado e constitui um dos frutos base da alimentação diária. A patulina existente numa maçã infectada foi analisada através da aplicação dos métodos desenvolvidos SPE-HPLC/DAD e MEPS-HPLC/DAD. Os cromatogramas obtidos encontram-se representados nas Figuras 2.4 e 2.5.

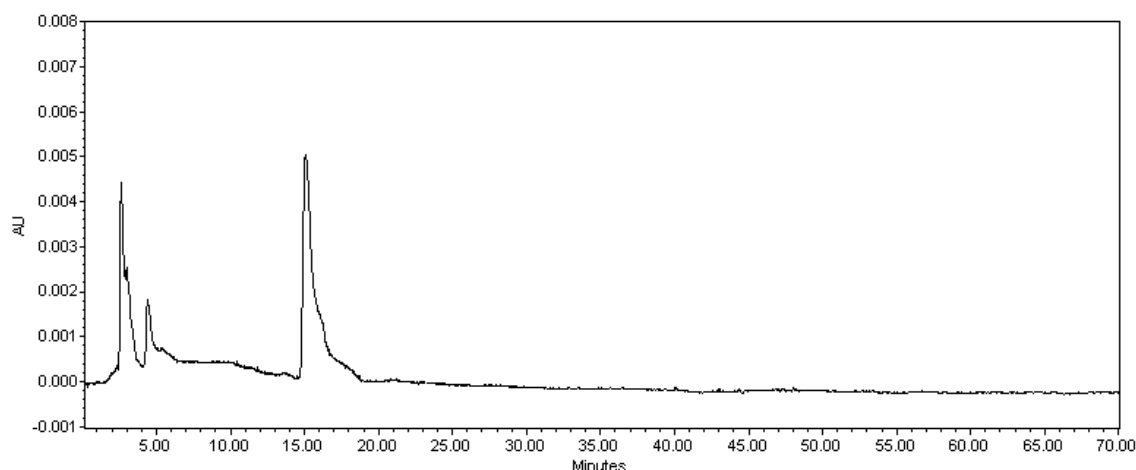


Figura 2.4 – Análise de patulina numa maçã infectada por SPE-HPLC/DAD. Coluna XBridge C₁₈ 5μm, fluxo: 1,0 mLmin⁻¹, eluição por gradiente a 15°C, condições descritas no ponto 4.3.2. da secção experimental. Detecção: DAD; cromatograma extraído a 280 nm.

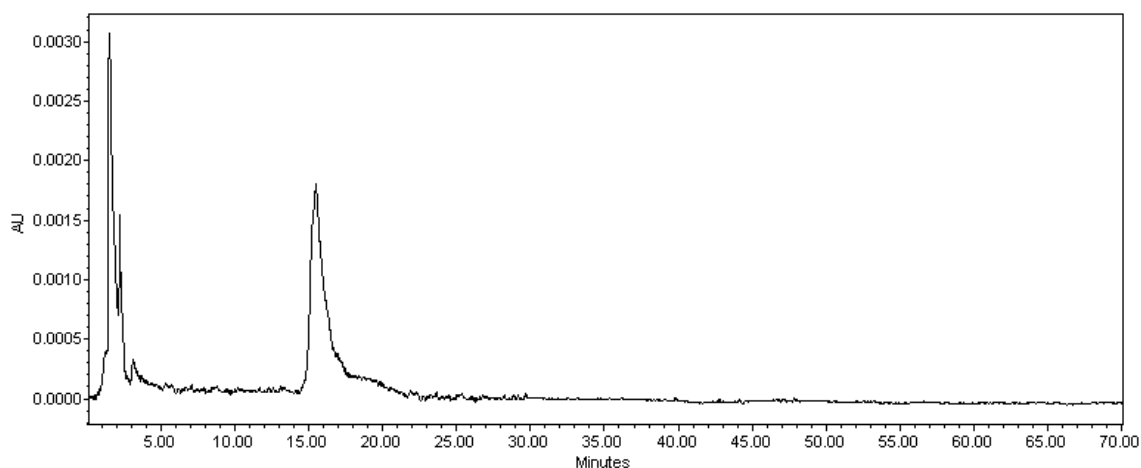


Figura 2.5 – Análise de patulina numa maçã infectada por MEPS-HPLC/DAD. Coluna XBridge C₁₈ 5μm, fluxo: 1,0 mLmin⁻¹, eluição por gradiente a 15°C, condições descritas no ponto 4.3.2. da secção experimental. Detecção: DAD; cromatograma extraído a 280 nm.

A quantidade total de patulina por quilograma de maçã infectada foi calculada por extrapolação dos valores encontrados nas amostras analisadas e estão descritos na Tabela 2.5. A análise da maçã infectada revelou um conteúdo elevado de patulina (131 ppm a 135 ppm), mostrando o perigo do consumo directo de maçãs contaminadas ou a sua utilização na produção de sumos de maçã.

Tabela 2.5 – Quantidade de Patulina determinada numa maçã infectada.

Método Analítico	Quantidade de Patulina
	(mgkg ⁻¹)
SPE-HPLC/DAD (n = 3)	130,9
MEPS-HPLC/DAD (n = 5)	134,6

2.4.2. Sumo de maçã comercial

Um sumo de maçã comercial foi analisado utilizando as metodologias desenvolvidas, não tendo sido detectada patulina.

De modo a verificar a aplicabilidade dos métodos analíticos desenvolvidos, SPE-HPLC/DAD e MEPS-HPLC/DAD, a matriz foi fortificada com um *spike* de patulina de 7,65 ng/50 µL (descrito na secção experimental 4.3.6.2.). Os cromatogramas obtidos encontram-se nas Figuras 2.6 e 2.7.

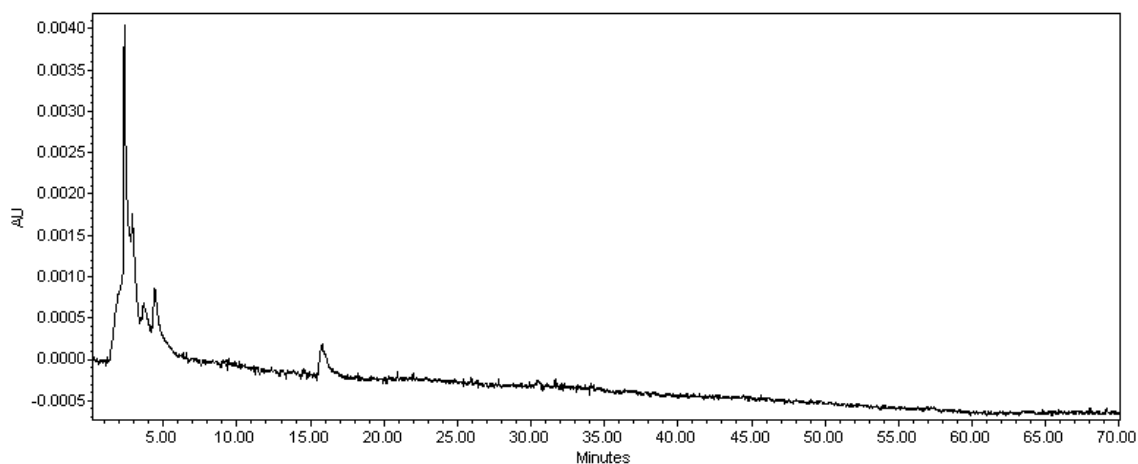


Figura 2.6 – Análise de um sumo de maçã comercial fortificado (*spike* de 7,65 ng/50 µL) por SPE-HPLC/DAD. Coluna XBridge C₁₈ 5µm, fluxo: 1,0 mLmin⁻¹, eluição por gradiente a 15°C, condições descritas no ponto 4.3.2. da secção experimental. Detecção: DAD; cromatograma extraído a 280 nm.

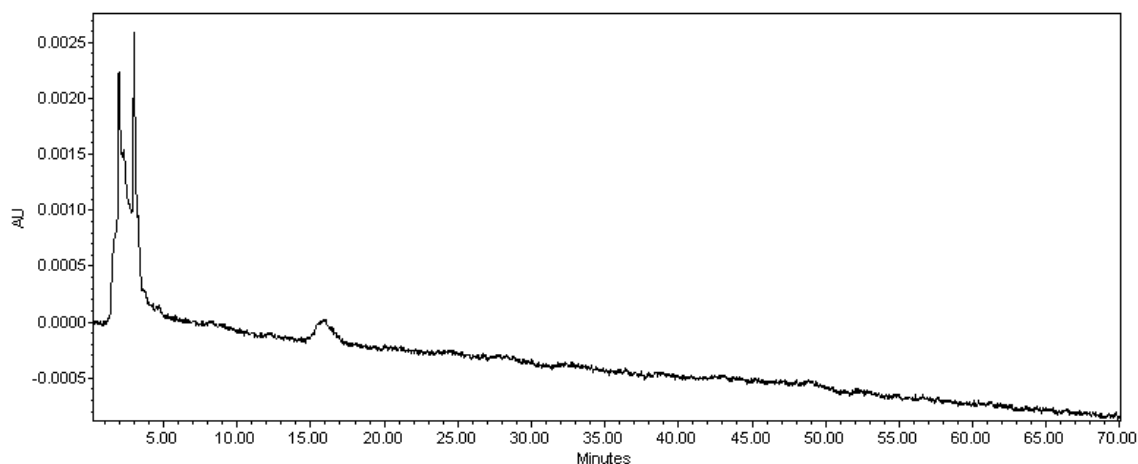


Figura 2.7 – Análise de um sumo de maçã comercial fortificado (*spike* de 7,65 ng/50 µL) por MEPS-HPLC/DAD. Coluna XBridge C₁₈ 5µm, fluxo: 1,0 mLmin⁻¹, eluição por gradiente a 15°C, condições descritas no ponto 4.3.2. da secção experimental. Detecção: DAD; cromatograma extraído a 280 nm.

Tendo em conta os resultados obtidos, a quantidade de patulina por litro de sumo de maçã fortificado foi calculada por extrapolação dos valores encontrados nas amostras analisadas e encontram-se na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Quantidade de Patulina determinada num sumo de maçã comercial fortificado.

Método Analítico	Quantidade de Patulina
	(mgL ⁻¹)
SPE-HPLC/DAD (n = 3)	8,5
MEPS-HPLC/DAD (n = 5)	8,4

Com os resultados obtidos é possível verificar que as metodologias analíticas desenvolvidas permitem a quantificação de patulina em matrizes como sumos de maçã contaminados. A quantificação da micotoxina em sumos de maçã pode ser realizada em quantidades pequenas, na ordem dos ppb, possibilitando o cumprimento dos limites exigidos pela legislação (Commission Regulation (EC) No 1881/2006).

3. CONCLUSÕES

3. CONCLUSÕES

Esta dissertação de Mestrado envolveu o desenvolvimento de metodologias de preparação de amostra associadas a um método cromatográfico (HPLC-DAD) para a análise de uma micotoxina, a patulina. Foi efectuada a sua validação e aplicação a matrizes alimentares comercialmente importantes a nível mundial.

O método cromatográfico foi otimizado com o intuito de reduzir o tempo de análise, uma vez que a nível industrial, dado o número de amostras a analisar, este é um parâmetro deveras importante.

A dissertação descreve a optimização de uma metodologia analítica que utiliza a extracção em fase sólida (SPE) como processo de preparação de amostra, e o desenvolvimento de um novo procedimento analítico, recorrendo à microextracção por seringa empacotada (MEPS). Ambos os processos foram associados ao método cromatográfico (HPLC-DAD) tendo-se mostrado adequados à análise e quantificação de patulina em matrizes alimentares, nomeadamente maçã e sumos.

O método SPE-HPLC/DAD revelou ser rápido, simples, eficaz, reprodutível e sensível. É adequado à análise de matrizes da cadeia alimentar de modo a verificar o cumprimento da legislação europeia e a sua segurança alimentar.

A nova metodologia MEPS-HPLC/DAD apresentou uma boa recuperação e a sua validação permite que constitua uma boa alternativa analítica para sumos comerciais. Este método permite eliminar alguns passos necessários em SPE, como a evaporação dos extractos e a retoma num volume e solvente adequados à análise cromatográfica, demonstrando ser de fácil utilização e reprodutível.

Ambos os métodos seguem as indicações da EC no que respeita a sustentabilidade, com redução da quantidade de solventes e amostra habitualmente necessários para análise, apresentando boas recuperações (82% para SPE-HPLC/DAD e 69% para MEPS-HPLC/DAD), encontrando-se assim disponível para ser utilizado e verificar-se o cumprimento dos limites exigidos pela legislação (Commission Regulation (EC) No 1881/2006).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Solventes e Padrões utilizados

Todos os solventes (de grau HPLC) utilizados foram obtidos da Aldrich (Alemanha). A água ultra-pura utilizada foi obtida de um aparelho de purificação MilliQ (unidade Millipore, E.U.A.). A patulina de pureza superior a 98 % foi adquirida à Aldrich (Alemanha).

4.2. Instrumentação e condições cromatográficas

Nesta secção descreve-se o equipamento e condições analíticas utilizadas no desenvolvimento dos métodos analíticos de preparação de amostra apresentados nesta dissertação.

4.2.1. Cromatografia Líquida (HPLC)

4.2.1.1. Bomba e Detector

Foram utilizados uma bomba Waters 600 e um detector de fotodiodos da Waters 996.

4.2.1.2. Coluna

Foi utilizada a coluna cromatográfica da Waters, XBridge 5 μm , 4,6 x 250 mm.

Foi usado um loop de 50 μL .

4.2.1.3. Fases móveis

Foram usadas duas fases móveis: Água-acetonitrilo- HClO_4 ((97:3):0,01 (v/v)) e Acetonitrilo-Ácido Perclórico ((100):0,01 (v/v)).

Todos os solventes foram filtrados e desgaseificados com hélio antes de utilizados.

4.2.1.4.Forno

Foi utilizado o forno de colunas *Jetstream VDS Optilab*.

4.3. Metodologia

Os procedimentos de preparação das soluções padrão de patulina e das matrizes alimentares, o método cromatográfico otimizado (HPLC-DAD), bem como as metodologias analíticas utilizadas e suas condições encontram-se descritos nesta secção.

4.3.1. Preparação de Soluções Padrão de Patulina

O padrão de patulina foi dissolvido em água MilliQ-ácido perclórico ((100):0,01 (v/v)), numa concentração de 100 ppm recorrendo a agitação no vortex durante alguns minutos.

A solução filtrada, por filtro de 0,45 µm da Millipore, foi utilizada na preparação de soluções padrão de concentrações inferiores por diluição. As soluções padrão foram preparadas em vials de 5 mL, compreendendo uma gama de concentrações de 30 ppb a 500 ppb. A análise destas soluções permitiu o cálculo da recta de calibração do método. O volume de injeção no HPLC foi de 50 µL.

4.3.2. Método cromatográfico com gradiente

A separação cromatográfica utilizou como fases móveis as misturas A: água-acetonitrilo-ácido perclórico ((97:3):0,01 (v/v)) e B: acetonitrilo-ácido perclórico ((100):0,01 (v/v)), a uma temperatura de 15°C, usando o seguinte programa de gradiente: A eluente inicial durante 18 min, seguido de um aumento linear de B até 80% durante 12 min, tendo sido mantida esta composição por 15 min, por fim A foi linearmente aumentado até 100% durante 15 min. A coluna no fim foi equilibrada durante 10 min com a fase móvel inicial (A) ficando preparada para a próxima injeção. A temperatura de análise foi de 15°C e o fluxo da eluição foi de 1,0 mLmin⁻¹. Os cromatogramas foram extraídos a 280 nm.

4.3.3. Preparação de Amostras Fortificadas

Para o desenvolvimento dos métodos analíticos de preparação de amostra preparam-se amostras fortificadas com patulina. Para tal, uma maçã saudável (livre de patulina) foi macerada e extraída três vezes com 50 mL de água acidificada (água MilliQ-ácido perclórico ((100):0,01 (v/v)). Os extractos foram recolhidos, filtrados por filtro de pregas e evaporados à secua utilizando o evaporador rotativo, com pressão reduzida e uma temperatura que não excedeu os 35°C. A amostra retomada em água acidificada, numa concentração aproximada de 1mgmL⁻¹, foi dissolvida recorrendo à agitação com *vortex*. A partir desta solução realizaram-se *spikes* de patulina numa gama de 200 ppb a 600 ppb.

4.3.4. Extracção em Fase Sólida

Para a preparação de amostra por SPE usou-se um sistema Lichrolut (Merck).

Os cartuxos de SPE, Supelclean LC-18, foram adquiridos à Supelco (Portugal).

4.3.4.1. SPE – Método descrito [36]

O condicionamento dos cartuxos de SPE de fase reversa C₁₈ foi realizado com 10 mL de metanol, 3 mL de metanol 10% e 10 mL de água. Sem deixar o cartuxo secar introduziu-se 0,5 mL de amostra deixando-a percorrer o cartuxo muito lentamente. Após a transferência lavou-se o cartuxo com 5 mL de hexano e deixou-se o cartuxo secar sob uma forte corrente de ar durante 15 min.

A extracção da patulina foi realizada posteriormente com 3 x 5 mL de uma gradação de solventes (hexano: acetato de etilo: acetona = 1:5:4, 1:4:5, 1:3:6, respectivamente), parando o fluxo de eluição entre cada extracção aproximadamente durante 1 min de modo a que o eluente tivesse maior contacto com o cartuxo. Com os extractos recolhidos e devidamente acidificados, foram evaporados à secua utilizando o evaporador rotativo, com pressão reduzida e uma temperatura que não excedeu os 35°C. Posteriormente foram retomados em 0,5 mL de água acidificada e injectados 50 µL no sistema de HPLC.

4.3.4.2. SPE – Método otimizado

O condicionamento dos cartuxos de SPE de fase reversa C₁₈ foi efectuado com 3 mL de metanol, 3 mL de metanol 10% e 3 mL de H₂O MilliQ-ácido perclórico ((100):0,01, (v/v)).

Sem deixar o cartuxo secar introduziu-se 0,5 mL de amostra deixando-a percorrer o cartuxo muito lentamente. Após a transferência lavou-se o cartuxo com 0,5 mL de água acidificada, sem deixar este secar.

A extracção da patulina foi realizada com 3 x 1 mL de metanol.

Os extractos de metanol foram recolhidos, evaporados à secura utilizando o evaporador rotativo, com pressão reduzida e uma temperatura que não excedeu os 35°C. Por fim, o extracto final foi retomado em 0,5 mL de água acidificada e injectados 50 µL no sistema de HPLC.

4.3.5. Microextracção em seringa empacotada

Para a realização da metodologia analítica de preparação de amostra por MEPS foram adquiridas à SGE uma seringa MEPS de 250 µL e um conjunto de BIN's contendo a fase estacionária de sílica modificada em C₁₈.

4.3.5.1. MEPS – Método novo

O condicionamento do BIN de fase reversa C₁₈ foi efectuado com 3 x 100 µL de metanol e 5 x 100 µL de H₂O MilliQ-ácido perclórico ((100):0,01 (v/v)).

Um volume de 25 µL de amostra fortificada passou pela fase estacionária 3 vezes, descartando-o na última extracção. Logo de seguida, repetiu-se a operação com novos 25 µL de amostra. Sem realizar o passo de lavagem do BIN, extraiu-se a patulina de modo análogo à introdução de amostra mas com metanol, isto é, 2 x (3 x 25 µL de metanol).

O extracto final, no total de 50 µL, foi injectado no HPLC.

4.3.6. Aplicação dos Métodos Analíticos a Matrizes Alimentares

4.3.6.1. Maçã Infectada

Para a determinação da quantidade de patulina existente numa maçã infectada, um exemplar deste fruto contaminado foi macerado e extraído três vezes com 50 mL de água acidificada (água MilliQ-ácido perclórico ((100):0,01 (v/v))). Os extractos foram recolhidos, filtrados por filtro de pregas e evaporados à secua utilizando o evaporador rotativo, com pressão reduzida e uma temperatura que não excedeu os 35°C.

A amostra retomada em água acidificada, numa concentração aproximada de 1mgmL⁻¹, foi dissolvida recorrendo à agitação com *vortex*. Esta amostra foi posteriormente analisada e quantificada utilizando as metodologias analíticas desenvolvidas nesta dissertação, SPE-HPLC/DAD e MEPS-HPLC/DAD.

4.3.6.2. Sumo de Maçã Comercial Fortificado

Para a determinação da quantidade de patulina existente num sumo de maçã, o conteúdo de um pacote de sumo de maçã de 300 mL, foi evaporado à secua utilizando o evaporador rotativo, com pressão reduzida e uma temperatura que não excedeu os 35°C.

De seguida, foram retomados em 10 mL de água acidificada 10 mg do extracto, sendo a dissolução efectuada recorrendo à agitação com *vortex*. Esta solução foi fortificada com patulina (7,65 ng/50 µL) tendo sido posteriormente analisada e quantificada utilizando as metodologias analíticas SPE-HPLC/DAD e MEPS-HPLC/DAD.

5. BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Songsermsakul, P.; Razzazi-Fazeli, E. A Review of Recent Trends in Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Detection of Mycotoxins. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 31: 1641 – 1686, 2008.
- [2] Sant’Ana, A.S.; Rosenthal, A.; Massaguer, P.R. The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Research International* 41: 441-453; 2008.
- [3] Kabak, B.; Dobson, A.D.W.; Var, I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46: 593 – 619, 2006.
- [4] Shephard, G.S. Determination of mycotoxins in human foods. *Chemical Society Reviews* 37: 2468 – 2477, 2008.
- [5] Krska, R.; Schubert-Ullrich, P.; Molinelli, A.; Sulyok, M.; MacDonald, S.; Crews, C. Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives and Contaminants* 25: 152-163; 2008.
- [6] Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516; 2003.
- [7] Worobo, R.W.; Moake, M.M.; Padilla-Zakour, O.I. Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1: 8 – 21; 2005 e referências aí citadas.
- [8] Kumar, V.; Basu, M.S.; Rajendran, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection* 27: 891 – 905; 2008.
- [9] Nielsen, K.F.; Smedsgaard, J. Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A* 1002: 111 – 136, 2003.

- [10] Celli, M.G.; Coelho, A.R.; Wosiacki, G.; Garcia-Cruz, C.H. Patulin: incidence and control in apple products. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina* 30: 135-161; 2009.
- [11] Iha, M.H.; Sabino, M. Determination of Patulin in Apple Juice by Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International* 89: 139 – 143, 2006.
- [12] Moss, M.O. Centenary review – Mycotoxins. *Mycological Research* 100: 513 – 523, 1996.
- [13] Gökmen, V.; Acar, J. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. *Journal of Chromatography A* 815: 99 – 102, 1998.
- [14] Salomão, B.C.M.; Slongoa, A.P.; Aragão, G.M.F. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. *LWT - Food Science and Technology* 40: 676 – 680; 2007.
- [15] Ugwuanyi, J.O.; Obeta, J.A.N. Pectinolytic and cellulolytic activities of heat resistant fungi and their macerating effects on mango and African mango. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1054 – 1059; 1999.
- [16] Leggott, N.L.; Shephard, G.S. Patulin in South African commercial apple products. *Food Control* 12: 73 – 76, 2001.
- [17] Silva, S.J.N.; Schuch, P.Z.; Bernardi, C.R.; Vainstein, M.H.; Jablonski, A.; Bender, R.J.; Patulin in food: state-of-the-art and analytical trends. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29: 406 – 413, 2007.
- [18] *World Health Organization*. 1995. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO. Forty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Geneva: Technical Report Series 859: 36 – 8.
- [19] *Official Journal of the European Union* COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006.

- [20] Shephard, G.S.; Leggott, N.L. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *Journal of Chromatography A* 882: 17 – 22, 2000 e referências nele contidas.
- [21] Welke, J.E.; Hoeltz, M.; Dottori, H.A.; Noll, I.B. Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã. *Brazilian Journal of Food and Technology* II SSA: 78 – 83, 2009 e referências nele contidas.
- [22] Gökmen, V.; Acar, J. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 847: 69 – 74, 1999.
- [23] Gökmen, V.; Acar, J.; Sarioğlu, K. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 543: 64 – 69, 2005.
- [24] Katerere, D.R.; Stockenström, S.; Shephard, G.S. HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings. *Food Control* 19: 389 – 392, 2008.
- [25] Sewram, V.; Nair, J.J.; Nieuwoudt, T.W.; Leggott, N.L.; Shephard, G.S. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 897: 365 – 374, 2000.
- [26] Gaspar, E.M.S.M.; Lucena, A.F.F. Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry* 114: 1576–1582, 2009.
- [27] Moukas, A.; Panagiotopoulou, V.; Markaki, P. Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. *Analytical Methods* 109: 860 – 867, 2008.
- [28] Roach, J.A.G.; White, K.D.; Trucksess, M.W.; Thomas, F.S. Capillary Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Chemical Ionization and Negative Ion Detection

for Confirmation of Identity of Patulin in Apple Juice. *Journal of AOAC International* 83: 104 – 112, 2000.

[29] Rupp, H.S.; Turnipseed, S.B. Confirmation of Patulin and 5-Hydroxymethylfurfural in Apple Juice by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International* 83: 612 – 620, 2000.

[30] Sheu, F.; Shyu, Y.T. Analysis of Patulin in Apple Juice by Diphasic Dialysis Extraction with in Situ Acylation and Mass Spectrometric Determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2711 – 2714, 1999.

[31] Rychlik, M.; Schieberle, P. Quantification of the Mycotoxin Patulin by a Stable Isotope Dilution Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3749 – 3755, 1999.

[32] Tsao, R.; Zhou, T. Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis for Rapid Analysis of Patulin in Apple Cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5231 – 5235, 2000.

[33] Ridgway, K.; Lalljie, S.P.D.; Smith, R.M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A* 1153: 36 – 53, 2007.

[34] Wu, R.-N.; Dang, Y.-L.; Niu, L.; Hu, H. Application of matrix solid-phase dispersion–HPLC method to determine patulin in apple and apple juice concentrate. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 582 – 586, 2008.

[35] Wu, R.-N.; Han, F.-L.; Shang, J. Analysis of patulin in apple products by liquid–liquid extraction, solid phase extraction and matrix solid-phase dispersion methods: a comparative study. *European Food Research and Technology* 228: 1009 – 1014, 2009.

[36] Li, J.-k.; Wu, R.-n.; Hu, Q.-h.; Wang, J.-h. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. *Food Control* 18: 530 – 534, 2007.

- [37] Arranz, I.; Derbyshire, M.; Kroeger, K.; Mischke, C.; Stroka, J.; Anklam, E. Liquid Chromatographic Method for Quantitation of Patulin at 10 ng/mL in Apple-Based Products Intended for Infants: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International* 88: 518 – 525, 2005.
- [38] Abdel-Rehim, M. AstraZeneca Application, *Current Patents Gazette*, WO 03019149, 77, 2003.
- [39] Raynie, D.E. Modern Extraction Techniques. *Analytical Chemistry* 78: 3997 – 4004, 2006.
- [40] Retirado de: <http://www.sge.com/products/meps>; MICRO EXTRACTION BY PACKED SORBENT: Online SPE for GC and LC sample preparation - extraction to injection in a single process. SGE Analytical Science, Setembro de 2009.
- [41] Blomberg, L.G. Two new techniques for sample preparation in bioanalysis: Microextraction in packed sorbent (MEPS) and use of a bonded monolith as sorbent for sample preparation in polypropylene tips for 96-well plates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393: 797 – 807, 2009.
- [42] Fontanals, N.; Marcé, R.M.; Borrull, F. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. *Journal of Chromatography A* 1152: 14 – 31, 2007.
- [43] Jönsson, S.; Hagberg, J.; Bavel, B.V. Determination of 2,4,6- Trichloroanisole and 2,4,6-Tribromoanisole in Wine Using Microextraction in Packed Syringe and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4962 – 4967, 2008.
- [44] Morales-Cid, G.; Cárdenas, S.; Simonet, B.M.; Valcárcel, M. Fully Automatic Sample Treatment by Integration of Microextraction by Packed Sorbents into Commercial Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Equipment: Application to the Determination of Fluoroquinolones in Urine. *Analytical Chemistry* 81: 3188 – 3193, 2009.

[45] Miller, J. C.; Miller, J. N., *Statistics for Analytical Chemistry*. Second Edition ed.; Ellis Horwood: Chichester, 1988.

[46] Guia RELACRE – *Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. In IPQ: 2000; Vol. 13.